云 南 植 物 研 究 7(4): 451—456, 1985
Acta Botanica Yunnanica

云南松雄配子在人工培养和自然条件下的发生*

刘成运

（中国科学院昆明植物研究所）

摘要 云南松（*Pinus yunnanensts* Fr.）花粉于三月在四细胞时期散粉。花粉在珠心顶端萌发，然后花粉管进入珠心组织，管核进入花粉管。第二年三月，休眠的花粉管在珠心内恢复活动，四月形成二个不等的雄配子。在雄配子周围有一些淀粉粒分布。花粉孵育在含蔗糖的培养基中生长要比在BKBM-WS培养基中缓慢。花粉粒及花粉管中含有大量直径4—8微米的淀粉粒，在不含蔗糖的培养基中，淀粉粒积累较少，直径约2—5微米。培养在2—5℃低温下的花粉可以缓慢地萌发，但不能形成雄配子。花粉管的伸出以及外壁的裂开总是发生在远极端薄壁区，花粉管可产生2—5条分枝或向两侧平行地生长，在萌发的早期，花粉粒以及花粉管中的细胞质十分稠密，蛋白质含量丰富。管核的蛋白质染色反应最深，生殖核次之。当生殖细胞分裂形成不育细胞及精原细胞后，管核染色反应稍有下降，花粉管中细胞质集中在顶端区域。当精原细胞分裂形成二精子时，花粉管中细胞质仅分布在二个精细胞及不育细胞和管核四周，其余部分已很少或缺乏。

关键词 云南松；雄配子；人工培养

松科植物成熟的花粉粒从传粉到雄配子形成需要一年左右的时间，这对于研究工作带来许多不便，Ho, R. H.，和他的合作者，在1968年曾用人工培养的方法观察了黄杉（*Pseudotsuga menziesii*）花粉的萌发，1970至1971年，他们又第一次成功地对落叶松（*Larix sibirica*）和铁杉（*Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg）进行了花粉萌发实验，从开始培养至二精子的形成仅需5天时间[8、9]。使雄配子形成的时间大大地缩短，这对于在离体条件下，对整体雄配子体发育的研究工作开辟了新的途径。但在松科中，对松属花粉人工培养的研究尚未见到有关的报道。作者应用BKBM-WS培养基也成功地对云南松花粉培养出雄配子，并探讨了在不同的培养条件下，花粉发育速度和形态的差异。裸子植物花粉的离体培养，使得能够在整体条件下进行形态学、组织化学的研究，避免因切片造成的细胞组分的丢失所引起的误差。这对于研究雄配子发生过程中一些物质的变化，探讨形态结构与生理功能之间关系等方面均有重要的意义。

材料和方法

云南松（*Pinus yunnanensis* Fr.）大孢子叶球采自本所植物园内。自3月初传粉至第二年受精前（约5月上旬），利用观察雌配子体发育的切片材料同时观察花粉的发

本文于1985年4月17日收到。

* 本研究得到王伏雄教授指导，特致衷心感谢。

育[1]。材料以纳瓦兴固定液固定，石蜡切片，厚10微米，PAS及铁矾苏木精染色。

人工培养的材料用当年2月底3月初刚成熟但尚未开裂的小孢子叶球，取回实验室，抖动果枝，使花粉散落在洁净的小玻皿内，置干燥器中低温保存待用。人工培养基用Brewbaker Kwack（1963）[4]培养基经Cook和Walden（1965）修改的BKBM-WS培养基[5]。不需灭菌，直接用于培养，同时在含有10%蔗糖以及在2—5°C低温条件下培养，观察花粉管生长及淀粉粒的变化。在不同培养时期取材料固定在10%中性福尔马林及卡诺氏固定液中，用PAS染色以及碘-碘化钾染色观察淀粉粒的变化，用汞-溴酚兰染色观察总蛋白质的变化[3]。

实 验 结 果

1.自然条件下花粉的发育

云南松花粉自2月底至3月中旬发育成熟，在四细胞时期飞散传粉[1]。花粉通过传粉滴（未观察此过程）进入倒生胚珠的珠被与珠心游离端之间的“花粉腔”内[8]（图版Ⅰ，1）。花粉进入后，保持数天不萌发，然后从花粉粒薄壁区生长出花粉管并进入珠心组织(图版Ⅰ，2—3)。随后管核到达花粉管的顶端附近。数周后，花粉管停止生长，在此状态下一直到第二年春季为止。第二年3月在珠心组织内花粉管开始恢复活动，此时珠心组织也开始迅速的生长，花粉管继续生长。3月下旬，生殖细胞进入花粉管并分裂形成不育细胞和精原细胞。4月初精原细胞分裂形成二个精细胞(图版Ⅰ，4)。由于不均等的生长，一个精细胞比另一个大，而大的精细胞多位于花粉管前进方向的前面，直径约27.5微米，后面是较小的精细胞，直径约20微米。在二精核周围有稠密的细胞质包围，从染色深度上来区分，大精核四周的细胞质要深些。在细胞四周有少量淀粉颗粒分布（图版Ⅰ，6—8）。在花粉管中位于最前端的是管核，后面是不育细胞，最后是二个精细胞，但有时不育细胞也位于二精细胞的后面。4月底，花粉管迅速生长并到达颈卵器顶部。

2.人工培养条件下花粉的发育

成熟的花粉含有二个已退化的原叶细胞，一个生殖细胞及一个管细胞，为四细胞花粉。在培养基中20—22°C第二天开始萌发，花粉管自远极端薄壁区伸出。在培养过程中花粉管生长的速度、长短、分枝数目以及内含淀粉粒的大小与数量均以培养基内含蔗糖与否而异。在含有蔗糖10%的Brewbaker和Kwack培养基中和含蔗糖20%的松花粉培养基中，花粉萌发的速度慢，在花粉粒及花粉管内积累了大量的淀粉粒，呈圆球形，少数呈椭圆形，直径约6—8微米。采用PAS染色时，因花粉管外壁多糖成分着色，影响对内部细胞质中淀粉粒的观察，采用碘-碘化钾染色或不用染色的活体观察，淀粉粒十分清晰（图版Ⅰ，3—4）。整个花粉管仅顶端生长区5—10微米区域无淀粉粒分布，但这一部分呈现PAS正反应，说明含有可溶性多糖碳水化合物。花粉管粗而短，最粗者几乎与花粉粒体的赤道面的宽度接近，约40微米。向二侧平行生长的花粉管略细，宽约13—25微米。长50—70微米。大部分为一条不分枝的花粉管，产生分枝者多为2—3条，最多可达5条。分枝多发生在一条花粉管远侧端三分之一处。在无菌震荡培

养处理中，花粉管很短或不形成，精核可能直接在花粉粒内形成（未发表资料）。在不含蔗糖的 BKBM-WS 培养基中，花粉管发育较快，较长。仅生长一条不分枝者在第 3 天长约19.5—25微米，第 6 天长约89.7—97.5微米，最长可达160微米，但宽度变化不明显，约在19—20微米之间。产生分枝者多在 2 — 3 条，最多达 4 条。淀粉粒的积累较少，颗粒直径 2 — 5 微米，多呈椭圆形或圆球形，主要分布在细胞或核的周围及萌发孔处。在距花粉管顶端约10—50微米的范围内无淀粉粒的积累，只有呈 PAS 正反应的可溶性多糖物质（图版 Ⅱ，1 — 2）。在上述二种培养基中，生殖核呈圆球形，直径约 7 — 8 微米，管核呈椭圆形，长15—20微米，宽11—13微米，当管核进入花粉管后，体积稍有扩大，并变为圆球形。用 BKBM-WS 培养基培养的花粉置 2 — 5 °C冰箱内50天，花粉可缓慢地萌发，一直发育到生殖细胞处于分裂期，但未观察到精细胞的形成。

应用汞-溴酚兰染色法，可以将花粉粒组织结构各部分清晰地显示出来，用此染色法既可进行蛋白质的定位，又可作为组织学观察。染色结果表明，管核显色最深，呈紫红色（异染现象），生殖细胞核次之，花粉管细胞质随在花粉管内含量分布的变化而呈现不同的兰色或兰紫色。在花粉管的顶端区域以及细胞或核的周围细胞质丰富，染色亦深。随着花粉管的伸长，细胞质主要集中在顶端生长区，而近花粉粒端染色仅仅靠花粉管壁原生质膜的部位以及花粉管腔中少量原生质带被染成浅兰色，中部已液泡化，不被染色（图版 Ⅱ，5 —10）。因此，花粉管发育的早期，花粉管中细胞质含量是丰富的，但随着发育的进程，细胞质逐渐地只集中在顶端生长区，以及生殖细胞或由它分裂形成的不育细胞、精原细胞的周围，以保证雄配子形成时的营养供给。

讨　　论

对于裸子植物花粉培养，因萌发时间较长，易被细菌或真菌污染。在无菌条件下培养时，花粉粒的消毒工作也不易进行彻底。因此培养不易获得成功。在应用组织和细胞培养基的研究报道中，花粉萌发需要一月以上，甚至达数月之久[10]。Ho，R. H.，等应用培养被子植物花粉的普通培养基，去掉蔗糖成分，即 BKBM-WS 培养基，成功地培养出了落叶松（*Larix sibirica*）和铁杉（*Tsuga heterophylla*）的花粉，并且从培养到二个精子的形成仅需 5 天时间[6－7]。本文应用此方法对云南松花粉进行培养也获得成功，但需 7 —10天时间，虽然形成精子的比率还很低，但仍能观察到，说明该培养基对松科花粉的培养均是适合的。

培育在 2 — 5 °C低温条件下的花粉仍可缓慢地萌发，虽不能形成精子，但这种耐低温的特性还是少见的，这可能与松属植物花粉的发育需要经历13个月漫长的时期，且要冬眠的遗传性有关。

通过松花粉萌发过程以及二精细胞形成过程中花粉粒及花粉管中淀粉及蛋白质含量与分布的变化，反映出这些物质的分布与代谢的活跃程度相关。在自然条件下，二个精核周围被浓稠的细胞质包围，在细胞周围又分布一些淀粉颗粒，虽然淀粉粒的数量不如白皮松（*P. bungeana*）二精核周围分布的多[2]，和西藏长叶松（*P. roxburghii*）较为相似[9]。在人工培养条件下，在花粉粒萌发的早期，显示了较高的蛋白质和淀粉的

含量。在生殖细胞和管核周围以及萌发孔处，淀粉粒分布较多，在花粉管中，淀粉粒也分布在细胞或核的周围。在花粉萌发初期，整个花粉粒及花粉管内充满了浓稠的细胞质，他们主要是含蛋白质化学成分，这一时期是花粉生命活动最活跃的时期，随着管核进入到花粉管内，花粉粒内淀粉及蛋白质含量明显下降，当生殖细胞也进入花粉管以后，花粉粒内已不含蛋白质及淀粉粒，而细胞质都集中在正处于伸长的花粉管的顶端生长区，以及包围在生殖细胞或由它分裂而成的不育细胞和精原细胞的周围。当二个精细胞形成时，仅在这些细胞或核的周围有蛋白质和少量淀粉粒的分布，花粉管其余部分基本上高度液泡化，处于衰退过程。因此，这些基本营养物质的分布总是围绕着雄配子的形成过程，对保证花粉管伸向颈卵器，以及雄配子的形态建成起着重要的营养供应作用。

参 考 文 献

〔1〕 刘成运，1985：云南松雌雄配子体的发育。云南植物研究，7(2):210—216。

〔2〕 陈祖铿、王伏雄，1982：白皮松受精作用的研究。植物学报，24(1):10—16。

〔3〕 徐是雄，1981：植物材料的薄切片超薄切片技术，北京大学出版社，58—59页。

〔4〕 Brewbaker, J. L., and Kwack, 1963: The essential role of *Calcium ions* in pollen germination and pollen tube growth. *Amer, J. Bot.*, 50:859—865.

〔5〕 Cook, F. S., and D. B. Walden, 1965; The male gametophyte of *Zea mays* L. Ⅱ. In vitro germination., *Can. J. Bot.*, 43:779—786.

〔6〕 Ho, R. H., and G. E. Rouse, 1970; Pollen germination of *Larix sibirica* (Siberian larch) in vitro., *Can. J. Bot.*, 48:213—215.

〔7〕 Ho, R. H., and O. Sziklai, 1971; Pollen germination of *Tsuga heterophylla* in vitro., *Can. J. Bot.*, 49:117—119.

〔8〕 Konar. R. N., and S. Ramchandini, 1958; The morphology and embryology of *Pinus wallichiana* Jack., *Phytomorphology* 8(3, 4):328—346.

〔9〕 Konar, R. N., 1960; The morphology and embryology of *Pinus roxburghii* Sar. with a comparison with *Pinus walliciana* Jack., *Phytomorphology* 10(3):305—319.

〔10〕 Rohr, R., 1980; Développement in vitro du pollen de *Ginkgo biloba* L., *Cytologia*. 45:481—495.

MALE GAMETOGENESIS OF PINUS YUNNANENSIS IN VITRO AND IN SITU DEVELOPMENT

Liu Chengyun

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract The pollen of *P. yunnanensis* is shed at the four celled stage in March. The pollen germinated at the top of nucellar tissue, then the pollen tube grew into the nucellar tissue and the tube nucleus into the pollen tube. In the second year, the resting pollen tube revives its activity in the nucellus towards the March. The two unequal male gamete formed in the April. Surrounding the male nuclei some starch grains were observed. The pollen incubated in the medium containing sucrose grew much slower than that in BKBM-WS. The pollen tube and pollen grains contained abundent starch grains. The grains are about 4 — 8 microns in dimeter, while the starch accumulation are less and 2 — 5 microns in dimeter in the medium without sucrose. The pollen may germinate slowly when the incubation was under the low temperature at 2 — 5° C in the refrigerator, but sperms were not developed. After the pollen germinated a pollen tube grew through the analept. 2 — 5 branches or two directional growth of the pollen tube were found. At the early stage of germination, the cytoplasm is very dense in the pollen grain and pollen tube. The protein staining of tube nucleus is the darkest, and the antheridial nucleus is the next.After the aterile cell and spermstogenous cell formed by the division of the antheridial cell. The staining of the tube nucleus became somewhat weakened. The cytoplasm accumulates at the top of the pollen tube. As the two male nuclei are formed by the division of the spermatogenous cell within the tube, the cytoplasm round the two male nuclei, sterile cell and the tube nucleus are dense and the other arts are less or scanty.

Key wards: *Pinus yunnanensis*; Male gamete; In vitro

EXPLANATION OF FLGURES

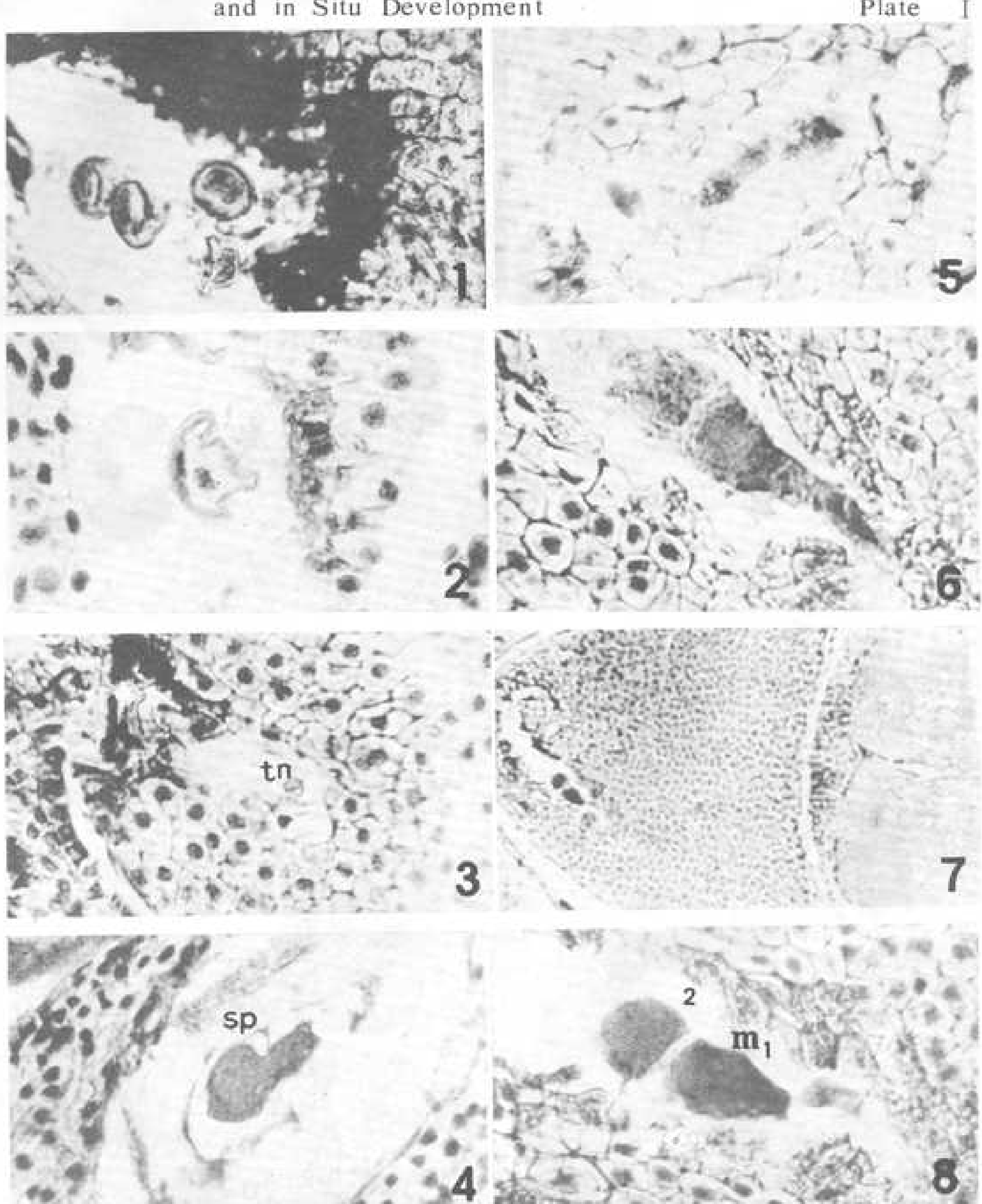
Plante　I

1. The pollen at the top of the nucellus × 600. The pollen tube extends to the nucellus × 600. 3. In the nucellus, the tube nucleus (tn) into the pollen tube × 600. 4. Two male cells formed by the division of the spermatogenous cell × 1000. 5. A section of tube showing the two nuequal male gamete, tube nucleus

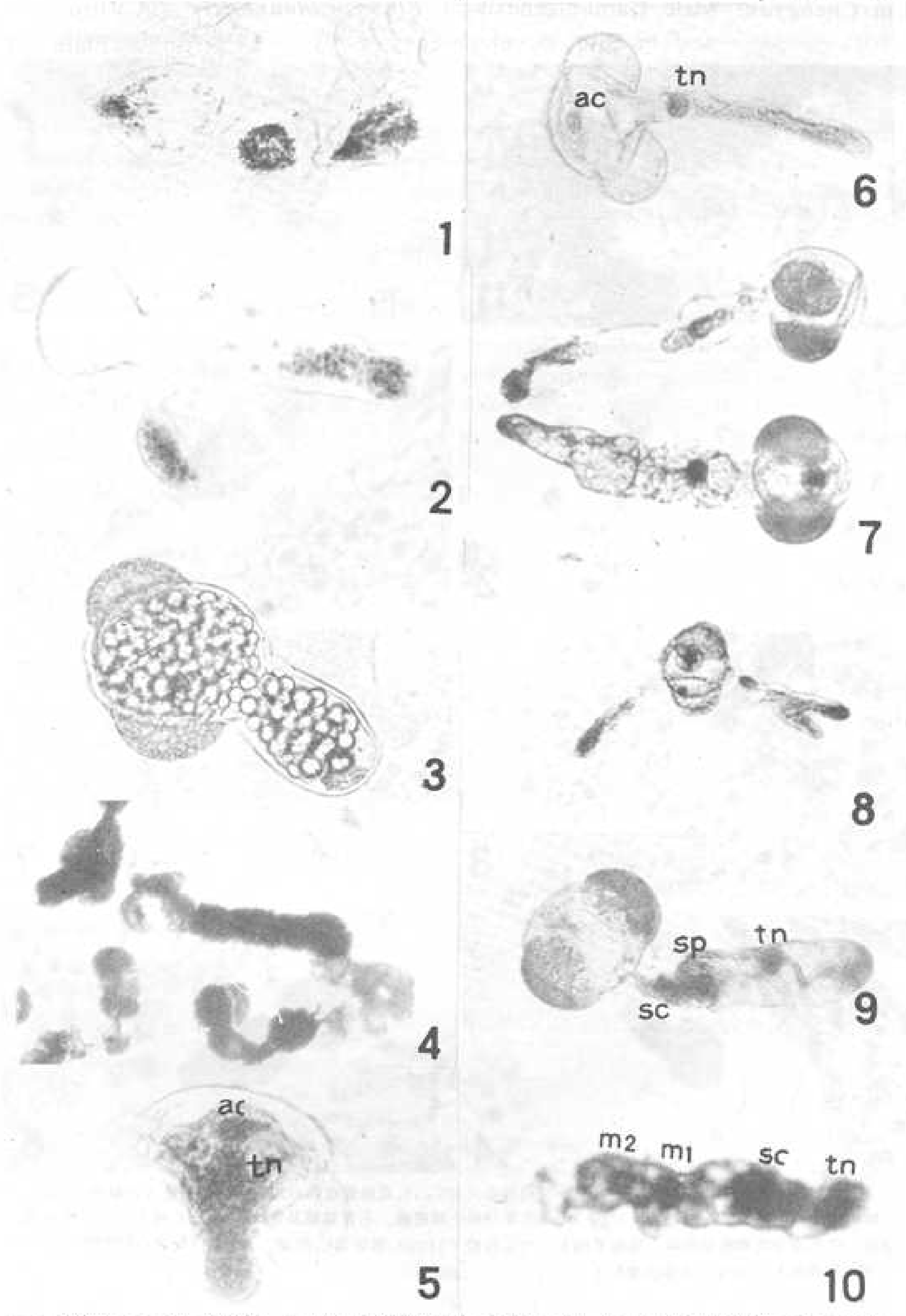
and the sterile cell ×800. 6. Showing the dense cytoplasm and some starch grains around the two uneuqal male gamete ×1400. 7. The archegonium formed, showing the pollen tube within the nucellar tissue ×200. 8. Enlarged part of Fig. 7 showing two unequal male gamete (m_1, m_2) ×1400.

Plante Ⅱ

1—4 showing starch, 5—10 showing protein. 1. At the early stage of the germination, showing distribution of the starch grains (two days) ×800. 2. Showing the distribution of the starch grains in the pollen tube (seven days) ×800. 3. The larch starch grains within the pollen grain and the pollen tube in vitro with sucrose (non-staining, seven days) ×800. 4. The staining of the starch grains staining with I-KI in vitro with sucrose (ten days) ×600. 5. Showing the abundant proteins in the pollen grain and pollen tube (two days) ×1350. 6—7. The tube nucleus in the pollen tube, and the staining of the protein is light in the pollen grain, but the top of the tube is darker. The staining of tube nucleus is darker than the antheridial nucleus (seven days) ×800. 8. Showing two directional growth and branching of the pollen tube (Eight days) ×600. 9. Showing spermatogenous cell (sp), sterile cell (sc) and tube nucleus (tn) (ten days) ×800. 10. Showing two unequale male gamete (m_1, m_2), sterile cell (sc) and tube nucleus (tn) with the cytoplasm (ten days) ×2000.



1. 花粉粒在珠心组织顶端 ×600 ；2. 花粉管伸向珠心 ×800 ；3. 花粉管在珠心组织内，管核进入花粉管 ×600 ；4. 精原细胞分裂形成二个精细胞 ×1000；5. 花粉管中两个精细胞、不育细胞及管核 ×800 ；6. 两个大小不等的精细胞，核周围有浓稠的细胞质，细胞外围有一些淀粉粒 ×1400；7. 颈卵器已形成，示花粉管在珠心组织内 ×200 ；8. 图7 局部放大，示两个不等的雄配子（m_1、m_2）×1400。



1—4.示淀粉；5—10．示蛋白质。1.萌发初期淀粉的分布（2天）×800；2.花粉管内淀粉粒分布（7天）×800；3.含糖BKBM- WS培养基内7天的花粉，在花粉粒及花粉管内充满了大颗粒淀粉粒（未染色）×800；4.在含糖的BKBM- WS培养基内10天，碘-碘化钾染色×600；5.萌发初期花粉粒及花粉管内蛋白质丰富（2天），生殖细胞(ac)、管核(tn)×1350；6—7．培养七天，花粉粒内蛋白质含量很低，花粉管顶端含量最高，管核进入花粉管，染色很深，×800；8.示向两侧生长及分枝的花粉管（8天）×600；9.示精原细胞(sp)、不育细胞(sc)和管核(tn)（10天）×800；10.示两精细胞（m_1、m_2）不育细胞和管核（10天）×2000。